

# THÈSE

présentée

à la FACULTÉ DES SCIENCES DE NANCY

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR DU 3<sup>ième</sup> CYCLE

par

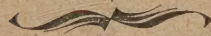
Paul Robert LEHR

*Licencié-ès-Sciences*



**TITRE :** Extraction et dosage de la vitamine B 1  
dans certains microorganismes.

**Soutenue le** 1960 devant la Commission d'Examen



*Président* ..... M. S. DAVID

*Examineurs* ..... { M. J. GAYET  
M. R. GAY

---

1960





# THÈSE

présentée

à la FACULTÉ DES SCIENCES DE NANCY

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR DU 3<sup>ième</sup> CYCLE

par

Paul Robert LEHR

*Licencié-ès-Sciences*



**TITRE :**      Extraction et dosage de la vitamine B 1  
dans certains microorganismes.

**Soutenue le**                      1960 devant la Commission d'Examen



*Président* . . . . . M. S. DAVID

*Examineurs* . . . . . { M. J. GAYET  
                                      M. R. GAY

---

1960



# FACULTÉ DES SCIENCES

---

DOYEN: M. URION

Assesseur: M. ECHEVIN

Doyens honoraires: MM. CORNUBERT, DELSARTE

Professeurs honoraires: MM. GUTTON, CROZE, RAYBAUD, FALLOT, LAFITTE, LERAY, DONZELOT, JOLY, LAPORTE, EICHHORN, CAPELLE, GODEMENT, DUBREIL, L. SCHWARTZ, DIEUDONNE, de MALLEMANN, LONGCHAMBON, LETORT, DODE, GAUTHIER, GOUDET, OLMER, CORNUBERT, CHAPELLE, CHEVALLIER.

Maîtres de conférences honoraires: MM. RAUX, LIENHART.

## PROFESSEURS

MM. URION, Chimie biologique  
DELSARTE, Analyse supérieure  
REMY, Zoologie  
ROUBAULT, Géologie  
VEILLET, Biologie animale  
ECHEVIN, Botanique  
WAHL, Chimie org. ind.  
BARRIOL, Chimie théorique  
BIZETTE, Physique  
GUILLIEN, Electronique  
GIBERT, Chimie physique  
HERVE, Calcul diff. et int.  
LEGRAS, Mécan. rationnelle  
DAVID, Chimie organique  
BOLFA, Minéralogie  
NICLAUSE, Chimie

MM. FAIVRE, Physique appliquée  
AUBRY, Chimie minérale  
COMOLET, Mécanique physique  
DUVAL, Chimie  
COPPENS, Radiogéologie  
FRUHLING, Physique  
LIONS, M.M.P.  
SUHNER, Physique expériment.  
HILLY, Géologie  
LE GOFF, Génie chimique  
CHAPON, Chimie biologique  
HEROLD, Chimie industrielle  
SCHWARTZ, Exploitation minière  
GAYET, Physiologie  
MANGENOT, Phytopathologie  
MALAPRADE, Chimie

## MAITRES DE CONFERENCES

MM. WERNER, Botanique  
GARNIER, Agronomie  
BRUHAT, Math. générales  
HADNI, Physique  
Mme ROIZEN, Physique  
REGNIER, Physico-chimie  
KERN, Minéralogie  
WEPPE, Minéral. appliquée  
LERMUSIAUX, Physique  
BERNARD, Géologie

MM. ARAGNOL, Mathém. (prop.)  
BONVALET, Mécanique appliq.  
BASTICK, Chimie  
RENARD, Phys. théor. et nucl.  
CONDE, Zoologie  
GOSSE, Génie chimique  
CHAMPIER, Physique  
GAY, Chimie biologique  
CLIN, Stratigraphie et Paléontol.  
N., Géologie

Secrétaire : M. LAPOINTE



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

*En Hommage Respectueux*

*à mon ancien Professeur du Lycée de Metz*

*Monsieur W. DELAFOSSE*



## AVANT-PROPOS

Le travail qui fait l'objet de cette thèse a été effectué sous la direction de Monsieur S. DAVID, Professeur à la Faculté des Sciences de Nancy. Nous exprimons à notre Maître notre profonde reconnaissance pour les conseils qu'il nous a prodigué à tout moment, et pour la formation que nous avons pu acquérir sous sa bienveillante direction au cours de ces deux années de troisième cycle.

Nos vifs remerciements vont également à Messieurs les Professeurs J. GAYET et R. GAY qui ont bien voulu accepter de faire partie de notre jury.

Nous exprimons particulièrement nos remerciements à Monsieur le Doyen URION grâce auquel nous avons entrepris ce troisième cycle de Biochimie Appliquée.

Notre reconnaissance va également à Monsieur le Professeur AUBRY qui a mis le spectrophotomètre à notre disposition, à Monsieur le Professeur MANGENOT pour ses conseils concernant la composition des milieux de culture, ainsi qu'à Monsieur CHEVALLIER qui nous a permis de pratiquer dans son laboratoire les différentes stérilisations.

La partie électrophorétique a été réalisée au Laboratoire Central des Hôpitaux de Nancy; à cette occasion, nous remercions Messieurs les Professeurs DE LAVERGNE et PAYSANT qui ont bien voulu mettre à notre disposition les appareils pour mener à bien ces travaux.

Nous n'oublions pas Monsieur HAN qui n'a pas ménagé ses peines pour nous initier aux méthodes électrophorétiques.

Enfin nos remerciements vont à notre ami Bernard ESTRAMAREIX dont la collaboration a été des plus fructueuses et dont nous garderons toujours un excellent souvenir.

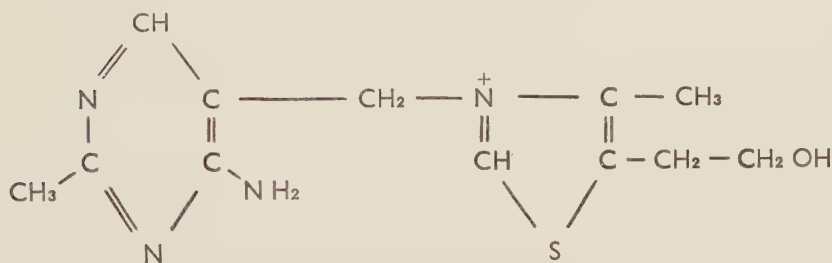


## INTRODUCTION

La vitamine B1 appelée également aneurine ou thiamine, est très abondante dans le péricarpe du riz, dans la levure, dans le germe de blé etc...

C.P. JANSEN et DONATH (1926) l'ont obtenue pour la première fois à l'état cristallisé à partir du péricarpe du riz. WINDAUS, à son tour, l'a extraite de la Levure mais toujours en partant de très grandes quantités de matières premières pour n'obtenir finalement que quelques grammes de vitamine.

Elle fut synthétisée par WILLIAMS en 1936 : sa formule résulte de l'union d'un noyau pyrimidique avec un noyau thiazole.



Formule de la Vitamine B1

Notre travail a eu pour but de mettre au point une méthode d'extraction et de purification de la vitamine B1 à partir de petites quantités de matières premières, de doser la vitamine dans l'extrait, et enfin d'étudier la composition en acides aminés de cet extrait.

Les microorganismes sur lesquels nous avons pratiqué ces extractions sont au nombre de 4 : Levure de boulangerie, Levure Haute, *Mucor racemosus* et *Neurospora crassa*, ces trois derniers provenant de cultures sur milieu approprié dépourvu de toute trace de vitamine B1.



## I) TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

### I) EXTRACTION DE LA THIAMINE

Les cellules de Levures ou les mycéliums, s'il s'agit de *Mucor racemosus* ou de *Neurospora crassa*, sont tout d'abord détruits par l'eau bouillante en présence d'une faible quantité de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  dilué. En effet, sous l'action de l'eau bouillante, les membranes cellulaires éclatent libérant ainsi le contenu cytoplasmique : le pH du milieu a tendance à devenir basique. La thiamine n'étant pas stable en milieu basique, l'adjonction d'une faible quantité de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  permet de maintenir le pH à des valeurs inférieures à pH 5.

Le contenu cellulaire ainsi libéré renferme à côté de la vitamine B1 proprement dite, des esters phosphoriques dont le pyrophosphate de thiamine ou cocarboxylase (3); pour convertir ceux-ci en thiamine libre, nous pratiquons une hydrolyse à l'aide de la takadiastase (4). Celle-ci, tout en hydrolysant les esters de la thiamine en thiamine libre et en acide phosphorique s'attaquera aussi à des molécules complexes (protéines par exemple) pour les fragmenter en éléments plus petits. Afin que cette takadiastase puisse agir d'une façon efficace, il est nécessaire de tenir compte des conditions optima d'action de ce mélange enzymatique: pH optimum compris entre 4 et 5, température optima 37°.

Après ce traitement enzymatique, les cellules détruites sont éliminées par centrifugation de sorte que nous obtenons un liquide surnageant limpide qui renferme la vitamine B1 et un grand nombre d'autres corps dont il faudra se débarrasser au cours des différentes étapes de purification qui suivent.

Nous allons d'abord faire passer le liquide d'extraction sur une colonne de résine échangeuse de cations, IRC 50 (type acide carboxylique  $-\text{COOH}$ ) sous forme hydrogène. En effet, selon J.E. VINCENT (4), si l'on fait passer une solution à pH 5,9 renfermant de la vitamine B1 sur une colonne de résine IRC 50 (forme  $\text{H}^+$ ), la vitamine est fortement adsorbée.

Cette première étape de purification permet donc de séparer la thiamine de toute une série de substances non adsorbables sur IRC 50 et que nous recueillons, par conséquent, dans l'effluent et dans les eaux de lavage de la colonne. La vitamine B1 de son côté, est décrochée à l'aide d'une élution par  $\text{HCl}$  1N.

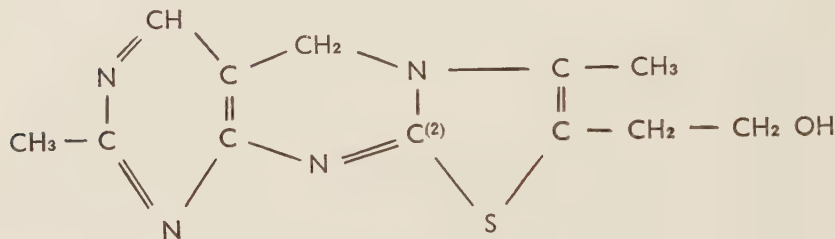
Pour purifier davantage la thiamine, nous avons recours à une colonne de résine échangeuse de cations (type acide sulfonique  $-\text{SO}_3\text{H}$ ) sous forme hydrogène. Lors du passage de l'éluat IRC 50 sur cette

colonne de résine IR 120, la vitamine B1 est fortement adsorbée alors que certains constituants qui accompagnèrent la thiamine dans l'éluat d'IRC 50, passent maintenant dans l'effluent ou bien sont décrochés lors du lavage de la colonne par HCl 1N. La vitamine B1 est alors éluee par HCl 3N.

En réduisant à sec à l'aide de l'évaporateur rotatif cet éluat d'IR 120 nous obtenons un résidu de couleur jaunâtre (quelques milligrammes) que nous dissolvons dans une très petite quantité d'eau distillée : ceci constitue l'extrait dont nous étudierons la composition ultérieurement.

## II) DOSAGE DE LA THIAMINE (5)

On oxyde la thiamine en thiochrome à l'aide de ferricyanure de potassium en milieu alcalin.



Formule du thiochrome

On assiste ici à une cyclisation : l'azote de la fonction amine primaire du noyau pyrimidique perd ses deux hydrogènes et se lie à l'atome de carbone numéroté 2 du noyau thiazole. Le thiochrome est un produit d'une fluorescence bleue intense, soluble dans l'isobutanol.

## III) PURIFICATION DE LA THIAMINE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

A l'extrait précédemment obtenu, nous faisons subir une chromatographie sur papier (3) : à cet effet, nous utilisons du papier Whatmann n° 3 et un solvant : n propanol, eau, tampon acétate pH 4,6 (70 : 20 : 10). La durée de cette chromatographie est d'environ 24 heures.

Comme la quantité de vitamine est très faible dans l'extrait, il est nécessaire d'ajouter de la vitamine synthétique afin de pouvoir la localiser sur le chromatogramme. En effet, pour déceler la vitamine B1 sur le chromatogramme, on pratique une révélation à l'aide du réactif signalé par D. et N. SILIPRANDI (3) dont voici la composition : ferricyanure de potassium 1%, NaOH 15%, et alcool absolu.

La thiamine est ainsi transformée sur le papier en thiochrome et apparaît sous forme d'une tache à fluorescence bleue vert à la lumière U.V.

Cette tache dont le  $R_f$  est voisin de 0,5 est en général assez étroite (quelques cms). En ayant recours à un témoin latéral que l'on aura révélé à l'aide du réactif de SILIPRANDI, il suffit de découper la zone correspondant à la tache de thiochrome; nous obtenons ainsi une bande que nous dénommons « bande vitaminique ». Il suffit alors d'éluer cette bande vitaminique pour récupérer la thiamine.

#### IV) ETUDE DE L'EXTRAIT

##### a) Fractionnement de base des acides aminés (2,7)

Pour avoir un aperçu général de la composition en acides aminés de l'extrait, nous allons lui faire subir une électrophorèse à pH 3,9. Cette dernière sera effectuée dans un appareil « en toit » (type Durrum) en chlorure de polyvinyle, sur papier Arches n° 304 (40 × 28 cm), sous une tension de 380 volts pendant 2 heures environ; on se servira d'un tampon à pH 3,9 (8) dont la composition est la suivante : pyridine, acide acétique, eau (30 : 100 : 4870). Le sens de la migration se fera dans le sens de la plus grande dimension, du pôle + au pôle —, le point de départ se situant à 12 cm du bord anodique. Après électrophorèse, la feuille est séchée puis révélée à l'aide du réactif suivant : ninhydrine à 1% dans acétone (p/v) contenant 10% (v/v) de tampon phosphate 0,05 M de pH 7. Cette électrophorèse permet d'obtenir essentiellement 4 zones bien distinctes constituées par : acide aspartique, acide glutamique, acides aminés à comportement neutre et acides aminés à comportement basique. Les amines, s'il en existe, sont situées en général au-delà de la zone des acides aminés à comportement basique.

##### b) Identification particulière des acides aminés «neutres»

Pour séparer les acides aminés «neutres» en vue d'une étude qualitative, nous éluons directement la bande des «neutres» à partir d'un électrophorégramme à pH 3,9 sur une feuille Whatmann n° 3 (57 × 46,5 cm) à l'aide du dispositif d'élution décrit par BISERTE (1). La séparation s'effectue alors par couplage d'une électrophorèse à pH 2,4 (tampon 2,4 : acide acétique 1N) et d'une chromatographie unidimensionnelle (solvant utilisé : butanol, acide acétique, eau - 4 : 1 : 5 -).

L'électrophorèse à pH 2,4 est effectuée dans un appareil « en toit » de grandes dimensions. Le sens de la migration se fait dans le sens de la plus grande dimension, du pôle + au pôle —, pendant 24 heures sous une tension de 380 volts, le point de départ se trouvant à 8 cm du bord anodique de la feuille et à 10 cm de l'autre bord.

Après séchage à la température ambiante pendant une nuit, on effectue la chromatographie suivant la deuxième dimension (durée :

24 heures). La feuille une fois séchée, on la révèle à l'aide du réactif suivant : ninhydrine à 1% dans acétone (p/v) contenant 10% (v/v) de tampon phosphate 0,05 M de pH 7.

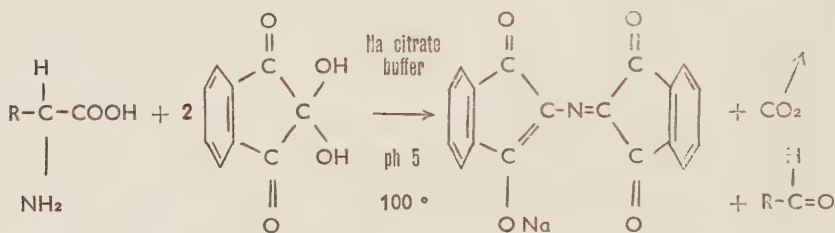
### c) Identification particulière des acides aminés «basiques»

La séparation des acides aminés basiques s'effectue à l'aide d'une électrophorèse à pH 11,7 (tampon pH 11,7 : ammoniacale 1N), dans un appareil «en toit» sur papier Whatmann n° 1, (du pôle — au pôle +, tension 380 volts, durée 14 heures) le point de départ étant situé à 11 cm du bord cathodique. Le dépôt des amino-acides se fait par élution directe (1) à partir de la bande qui contient les acides aminés basiques et qui a été découpée sur un électrophorégramme à pH 3,9. L'électrophorégramme une fois séché, on le révèle à l'aide du réactif suivant : ninhydrine à 1% dans acétone (p/v) contenant 6% (v/v) d'acide acétique. L'acide acétique sert en effet à neutraliser l'ammoniacale qui a servi de tampon lors de l'électrophorèse à pH 11,7.

### d) Révélation à la ninhydrine (11)

La ninhydrine donne avec les acides aminés une coloration violette en agissant sur la fonction amine  $-NH_2$  de ceux-ci.

Réaction :



Cependant cette réaction colorimétrique à la ninhydrine n'est pas spécifique des groupements  $-NH_2$  des acides aminés; les groupes  $-NH_2$  des peptides, certaines amines (histamine, tyramine, colamine etc...) et même  $NH_3$  donnent de bonnes colorations avec la ninhydrine.

### e) Dosage des acides aminés (2,9)

Après passage de l'électrophorégramme dans le réactif à base de ninhydrine, on le laisse sécher 1 heure en atmosphère dépourvue d'ammoniac jusqu'à apparition nette des taches correspondant aux acides aminés, puis on le place dans une étuve à 37° pendant 15 heures. La surface englobant la totalité de la coloration correspondant à l'acide aminé à doser et une surface voisine de même dimension servant de «blanc» sont découpées et élues chacune par 3 ml d'acétone contenant 25% d'eau, sous agitation discontinue pendant 20 minutes.

Les colorations des liquides obtenus sont lues au spectrophotomètre à 575  $m\mu$ . L'estimation quantitative se fait en se reportant à des gammes de référence établies une fois pour toutes dans les mêmes conditions expérimentales.

## V) ETUDE DE LA BANDE VITAMINIQUE

Pour nous rendre compte de l'efficacité de la purification à l'aide de la chromatographie sur papier, il est intéressant d'étudier les corps qui accompagnent encore la thiamine au niveau de la bande vitaminique. C'est pourquoi, nous réalisons une électrophorèse à ph 3,9 après avoir élué, au préalable, cette bande sur une feuille Arches n° 304 à l'aide du dispositif de BISERTE (1).



## II) RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

### I) MILIEUX DE CULTURE

#### a) Levure Haute (6)

Pour faire un litre de milieu de culture :

|                                                  |      |               |
|--------------------------------------------------|------|---------------|
| $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$                  | 2    | g             |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$        | 1    | g             |
| $\text{Cl}_2 \text{ Ca}$                         | 0,2  | g             |
| $\text{SO}_4\text{Fe}$                           | 1    | cg            |
| saccharose                                       | 60   | g             |
| acide lactique                                   | 3,5  | g             |
| lactate de K en solution à 50%                   | 12   | $\text{cm}^3$ |
| N sous forme de $\text{PO}_4\text{Am}_2\text{H}$ | 0,35 | g             |

vitamines indispensables :

|                    |    |    |
|--------------------|----|----|
| inositol           | 20 | mg |
| panthotenate de Ca | 2  | mg |
| biotine            | 2  | ~  |

vitamines non indispensables :

|                         |     |   |
|-------------------------|-----|---|
| acide paraminobenzoïque | 200 | ~ |
| nicotinamide            | 400 | ~ |
| riboflavine             | 100 | ~ |

Le ph du mélange est ajusté à ph 5 à l'aide de carbonate de Na.

#### b) *Mucor racemosus* (Milieu de CZAPEK modifié)

Pour faire un litre de milieu de culture :

|                                           |                                             |     |    |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------|-----|----|
| $\text{NO}_3\text{Na}$                    | 2 g remplacés par $\text{NO}_3 \text{NH}_4$ | 1   | g  |
| $\text{PO}_4 \text{HK}_2$                 |                                             | 1   | g  |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |                                             | 0,5 | g  |
| KCl                                       |                                             | 0,5 | g  |
| $\text{SO}_4 \text{Fe}$                   |                                             | 1   | cg |
| glucose                                   |                                             | 50  | g  |

et les vitamines suivantes :

|                         |     |    |
|-------------------------|-----|----|
| biotine                 | 2   | ~  |
| inositol meso           | 2   | mg |
| panthotenate de Ca      | 400 | ~  |
| acide paraminobenzoïque | 200 | ~  |
| nicotinamide            | 400 | ~  |
| riboflavine             | 100 | ~  |

### c) *Neurospora crassa* (10)

Pour faire un litre de milieu de culture :

|                                      |       |
|--------------------------------------|-------|
| tartrate d'ammonium                  | 5 g   |
| nitrate d'ammonium                   | 1 g   |
| PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K     | 1 g   |
| SO <sub>4</sub> Mg 7H <sub>2</sub> O | 0,5 g |
| ClNa                                 | 0,1 g |
| Cl <sub>2</sub> Ca                   | 0,1 g |
| saccharose                           | 20 g  |
| biotine                              | 5 γ   |

Les ions métalliques à ajouter à l'état de traces sous forme de sels sont ici remplacés par de l'eau du robinet qui en contient toujours suffisamment.

On pratique l'ensemencement dans un Erlen de 300 ml renfermant 60 ml de milieu de culture dans le cas de la Levure Haute; pour *Mucor racemosus* et *Neurospora crassa*, cet ensemencement se fait dans un Erlen de 2 litres renfermant 100 ml de milieu de culture. Avant l'ensemencement, on pratique une stérilisation du milieu de culture dans l'autoclave à 100°, à la pression ordinaire pendant une heure.

Les milieux ensemencés sont placés à l'étuve à Bactéries à 25°.

## II) EXTRACTION DE LA THIAMINE

### 1) Levure Haute

#### a) *Extraction préliminaire (Extrait n° 0)*

Au milieu de culture renfermant la suspension de cellules de Levure Haute, on fait subir une centrifugation :

poids de Levure pressée obtenue : 0,820 grammes

On transfère les cellules de Levure dans un Erlen de 25 ml à l'aide de 3 ml d'eau distillée, puis on ajoute 0,6 ml de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 0,1 N. L'ensemble est alors placé pendant 15 minutes au bain-marie bouillant. Après refroidissement, la solution est ajustée à pH 5 avec de l'eau de baryte saturée; on ajoute 50 mg de takadiastase et on place le tout à l'étuve à 37° pendant une nuit. Après centrifugation, le surnageant est amené à pH 5,9 à l'aide d'eau de baryte saturée; le précipité de sulfate de baryum formé est à son tour éliminé par centrifugation.

Le liquide surnageant est alors adsorbé sur une colonne de résine IRC 50. Lavage de la colonne avec 12 ml d'eau distillée, puis élution par 16 ml d'HC1 1N.

L'éluat IRC 50 est adsorbé à son tour sur une colonne de résine IR 120 qu'on lave ensuite avec 150 ml d'HC1 1N. On élue ensuite la colonne par HC1 3N; en faisant passer alors l'éluat IR 120 à l'évaporateur rotatif, nous obtenons un résidu jaunâtre qui constitue l'extrait n° 0.

*b) Extraits n° I, II et III.*

On prépare alors 6 erlens renfermant chacun 60 ml de milieu de culture. La durée de croissance des 4 premiers est de 8 jours, celle des 2 derniers de 6 jours.

Après centrifugation, on obtient les poids de Levure suivants :

|                   |      |         |         |
|-------------------|------|---------|---------|
| milieu de culture | n° 1 | 1,114 g |         |
| «                 | «    | n° 2    | 1,005 g |
| «                 | «    | n° 3    | 1,063 g |
| «                 | «    | n° 4    | 1,025 g |
| «                 | «    | n° 5    | 1,223 g |
| «                 | «    | n° 6    | 1,000 g |

On réunit les cellules provenant des milieux de culture 1 et 2 en une fraction I (2,12 g), celles des milieux de culture 3 et 4 en une fraction II (2,088 g), et celles des milieux de culture 5 et 6 en une fraction III (2,223g)

Voici donc les traitements auxquels vont être soumise chacune des deux premières fractions de Levure Haute.

Les cellules sont recueillies dans un Erlen de 25 ml à l'aide de 10 ml d'eau; on ajoute 1,7 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0,1N et on place le tout au bain-marie bouillant pendant 15 minutes.

Après refroidissement, la solution est amenée à un ph compris entre 4 et 5 à l'aide d'une solution de baryte saturée.

Adjonction de 140 mg de takadiastase, puis séjour pendant une nuit dans l'étuve à 37°.

Après avoir éliminé les cellules mortes par centrifugation, on obtient une solution (solution de la fraction I ph 4,3; solution de la fraction II ph 4,0) à laquelle on ajoute de l'eau de baryte saturée jusqu'à ph 5,9. Puis nouvelle centrifugation pour éliminer le précipité de sulfate de baryum.

Le surnageant est adsorbé sur une colonne de résine IRC 50 de 2,4 ml à l'état humide (sous forme  $\text{H}^+$ ). Lavage de la colonne avec 28 ml d'eau puis élution avec 42 ml d'HC 1 1N.

L'éluat IRC 50 est adsorbé sur une colonne de résine IR 120 de 2,8 ml à l'état humide (sous forme  $\text{H}^+$ ). Lavage de la colonne par 210 ml d'HC 1 1N. Puis élution par 280 ml d'HC 1 3N qu'on évapore à sec au rotatif jusqu'à obtention d'un résidu jaunâtre qu'on dessèche totalement dans un dessicateur sur de la potasse.

Quant à la fraction n° III, dont le poids est légèrement supérieur, nous allons lui faire subir une extraction en augmentant simplement, d'une part la quantité de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0,1N (1,8 ml au lieu de 1,7 ml), d'autre part le volume de la colonne IRC 50.

Le surnageant à ph 5,9 est adsorbé sur une colonne de résine IRC 50 de 2,5 ml à l'état humide ( $\text{H}^+$ ). Lavage avec 30 ml d'eau puis élution par 45 ml d'HC 1 1N.

L'éluat IRC 50 est adsorbé, comme précédemment, sur une colonne de résine IR 120 de 2,8 ml. Lavage de la colonne avec 210 ml d'eau puis élution par 280 ml d'HC 1 3N.

L'éluat est alors évaporé à sec au rotatif et le résidu final séché pendant une nuit au dessiccateur sur de la potasse.

Voici les poids de résidu obtenu à partir des trois fractions de Levure :

|                                      |              |
|--------------------------------------|--------------|
| Poids de résidu obtenu pour fraction | I : 5,5 mg   |
| « « « «                              | II : 5,0 mg  |
| « « « «                              | III : 9,0 mg |

Ces trois résidus, provenant des fractions I, II et III sont dissous respectivement dans 0,45 ml (extrait n° I), 0,4 ml (extrait n° II), et 0,7 ml (extrait n° III) d'eau distillée.

## 2) *Mucor racemosus*

Après avoir ensemencé 3 milieux de culture, nous les plaçons à l'étuve à 25° pendant 6 jours. On recueille alors les mycéliums sur Büchner, ce qui permet d'éliminer le milieu de culture, et on les pèse immédiatement.

|            |                   |         |
|------------|-------------------|---------|
| Mucor n° 0 | poids de mycélium | 4,908 g |
| Mucor n° 1 | « «               | 0,996 g |
| Mucor n° 2 | « «               | 1,089 g |

Nouvelles pesées après un séjour de 4 heures au dessiccateur sur P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> :

|            |                   |         |
|------------|-------------------|---------|
| Mucor n° 0 | poids de mycélium | 1,040 g |
| Mucor n° 1 | « «               | 0,224 g |
| Mucor n° 2 | « «               | 0,216 g |

Puis nouvelles pesées après une nuit sur P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> :

|            |                   |         |
|------------|-------------------|---------|
| Mucor n° 0 | Poids de mycélium | 0,389 g |
| Mucor n° 1 | « «               | 0,224 g |
| Mucor n° 2 | « «               | 0,216 g |

### a) *Extraction préliminaire (Extrait n° 0)*

Aux 0,389 grammes de mycélium sec, on ajoute 10 ml d'eau distillée et 0,8 ml de HC 1 0,1N et on place le tout au bain-marie bouillant pendant 15 minutes; le papier indicateur doit alors déceler un ph inférieur à ph 5 (ici le ph obtenu est environ de 4). Après refroidissement, le mélange est amené à ph 5 avec de l'eau de baryte saturée.

Après avoir ajouté 0,100 g de takadiastase, on place le tout à l'étuve à 37° pendant une nuit. Après ce traitement enzymatique, le mélange est ajusté à ph 6, puis centrifugé.

Le surnageant limpide est adsorbé sur une colonne de résine IRC 50, qu'on lave ensuite avec 20 ml d'eau distillée. Puis élution par 30 ml d'HC 1 1N. Cet éluat IRC 50 est à son tour adsorbé sur une colonne

de résine I R 120. On lave alors la colonne avec 150 ml d'HC 1 1N, puis on pratique une élution par 200 ml d'HC 1 3N.

Le résidu obtenu en évaporant à sec au rotatif l'éluat IR 120 constitue l'extrait n° 0.

### *b) Extraits n° I et II*

Comme les mycéliums des *Mucor* n° I et II ont des poids sensiblement voisins, nous allons leur faire subir à chacun un traitement identique. Voici donc le traitement commun aux deux mycéliums.

Au mycélium, réduit en petits fragments, nous ajoutons 10 ml d'eau distillée et 1 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0,1N; le tout est alors placé au bain-marie bouillant pendant 15 minutes. Après refroidissement le mélange (ph 3,2 pour *Mucor* n° I, ph 2,9 pour *Mucor* n° II) est amené à ph 4,8 à l'aide d'eau de baryte saturée.

On ajoute à chaque mélange 0,100 grammes de takadiastase et on les place à l'étuve à Bactéries (37°) pendant une nuit.

Après ce traitement enzymatique, on pratique une première centrifugation pour éliminer les restes de mycélium; les solutions obtenues ont chacune un ph de 4. On ajuste alors à ph. 5,9 à l'aide d'eau de baryte saturée; le sulfate de baryum formé est éliminé par centrifugation.

Chaque surnageant ainsi obtenu est adsorbé sur une colonne de résine IRC 50 de 4 ml à l'état humide (sous forme  $\text{H}^+$ ). Après un lavage de la colonne à l'aide de 40 ml d'eau distillée, on l'élue par 50 ml d'HC 1 1N.

Cet éluat IRC 50 est ensuite adsorbé sur une colonne de résine IR 120 dont le volume à l'état humide est de 4,5 ml (sous forme  $\text{H}^+$ ). A un lavage de la colonne par 300 ml d'HC 1 1N succède une élution par 400 ml d'HC 1 3N.

Voici les poids de résidu obtenus en évaporant les éluats IR 120.

|                                                        |        |
|--------------------------------------------------------|--------|
| Poids de résidu obtenu à partir de <i>Mucor</i> n° I : | 9,5 mg |
| « « « « « n° II :                                      | 8,0 mg |

On dissout le résidu provenant de *Mucor* n° I dans 10 ml d'eau distillée et on en prélève 2 ml en vue d'un dosage vitaminique. Les 8 ml qui subsistent sont évaporés à sec de sorte que le poids de résidu final n'est plus que de 7,6 mg.

Ces deux résidus (7,6 mg pour *Mucor* n° I; 8 mg pour *Mucor* n° II) sont dissous respectivement dans 0,6 ml (extrait n° I) et 0,65 ml (extrait n° II) d'eau distillée.

### **3) *Neurospora crassa***

Un milieu de culture ensemencé à l'aide d'une souche datant du 7 novembre 1959, est placé à l'étuve à 25° pendant 21 jours. Après avoir vérifié que le milieu de culture ne renfermait aucune trace de con-

tamination, le mycélium est recueilli sur Büchner, puis placé au dessiccateur sur  $P_2O_5$  pendant environ 24 heures. En pesant alors le mycélium, nous obtenons un poids sec de 0,243 grammes.

L'extraction vitaminique sera effectuée sur ces 0,243 grammes de mycélium sec. Ces derniers, réduits en petits morceaux, sont placés dans un Erlen de 25 ml en présence de 10 ml d'eau distillée et 1,2 ml de  $SO_4H_2$  0,1N. Le tout est alors placé au bain-marie bouillant pendant 30 minutes. Après refroidissement, le pH du milieu est de 3,5. On ajoute, par conséquent de l'eau de baryte saturée jusqu'à pH 5, puis 0,100 g de takadiastase; l'ensemble est alors placé à l'étuve (37°) pendant une nuit.

Les débris tissulaires une fois éliminés par centrifugation, le liquide surnageant est ajusté à pH 5,9 à l'aide d'eau de baryte saturée; le sulfate de baryum alors formé est éliminé à l'aide d'une nouvelle centrifugation.

Le surnageant ainsi obtenu est adsorbé sur une colonne de résine IRC 50 de 4 ml à l'état humide (sous forme  $H^+$ ). Lavage de la colonne avec 40 ml d'eau distillée, puis élution par 50 ml d' $HCl$  1N. L'éluat IRC 50 est ensuite adsorbé sur une colonne de résine IR 120 de 4,5 ml à l'état humide ( $H^+$ ). Après avoir lavé la colonne avec 300 ml d' $HCl$  1N, on pratique une élution par 400 ml d' $HCl$  3N. L'éluat IR 120 est amené à sec au rotatif.

Poids de résidu obtenu : 9 mg

Ces 9 mg de résidu sont dissous dans 10 ml d'eau distillée; 2 ml de cette solution servent au dosage vitaminique alors que les 8 ml qui subsistent et qui renferment 7 mg de résidu sont réduits à sec à l'évaporateur rotatif.

Le dépôt résiduel ainsi obtenu au fonds du ballon est dissout dans 0,55 ml d'eau distillée : ceci constitue l'extrait dont nous étudierons la composition ultérieurement.

#### 4) Levure de boulangerie

Nous allons extraire la vitamine B1 à partir de 100 grammes de Levure de Boulangerie pressée. A ces 100 grammes de Levure, on ajoute 150 ml d'eau distillée et 200 ml de  $SO_4H_2$  0,1N. On chauffe le tout au bain-marie bouillant pendant une heure : le mélange final obtenu a un pH compris entre 3 et 4. Au mélange amené à pH 5 avec de l'eau de baryte saturée, on ajoute 5 grammes de takadiastase; le tout est placé à l'étuve à 37° pendant 20 heures environ. Après ce traitement enzymatique le mélange est à pH 4,5; il suffit alors d'ajuster à pH 5,9 puis de centrifuger le mélange pour obtenir une solution transparente à coloration jaune.

Cette solution est adsorbée sur une colonne de résine IRC 50 de 90 ml; l'effluent qu'on recueille a un pH de 3,3. Après un lavage de la colonne à l'aide de 1400 ml d'eau distillée, on élue par 2000 ml de  $HCl$  1N: ceci constitue l'éluat IRC 50 qu'on dénommera solution A.

La suite des opérations se fera sur 150 ml de la solution A. Ces 150 ml d'éluat IRC 50 sont donc adsorbés sur une colonne IR 120 de

10 ml à l'état humide (forme  $H^+$ ). Lavage de la colonne avec 500 ml d' $HCl$  1N, puis élution par 1000 ml d' $HCl$  3N (ceci constitue donc l'éluat IR 120 qu'on désignera par - solution B-).

De la solution B nous prélevons 100 ml pour effectuer le dosage vitaminique; les 900 ml qui subsistent sont amenés à sec dans l'évaporateur rotatif.

Poids de résidu au fond du ballon : 67,6 mg

Si nous calculons le poids de résidu par gramme de Levure pressée nous obtenons 10 mg de résidu.

Ce résidu renferme en dehors de produits organiques accompagnant la thiamine, une certaine quantité de  $ClNa$  provenant probablement d'ions  $Na^+$  qui sont demeurés adsorbés sur la colonne lors de la cyclisation de cette dernière. Il faudra donc s'en débarrasser. En conséquence on dissout à chaud dans 5 ml d'alcool éthylique le résidu (67,6 mg) et on filtre; le chlorure de sodium, très peu soluble dans l'alcool reste sur le filtre. Après évaporation de l'alcool, on obtient un résidu jaunâtre dont le poids est de 27 mg, ce qui correspond donc à 4 mg de résidu par gramme de Levure pressée.

Ces 27 mg de résidu sont dissous dans 200 ml d'eau distillée; ceci constitue la «solution C» qui nous servira dans l'étude de l'extrait.

### III) DOSAGE DE LA THIAMINE

#### 1) Méthode générale de dosage

##### a) Réactifs

solutions étalons à 0,5%, 0,1% et 0,01% de thiamine par ml.  
solution de soude à 15%  
isobutanol saturé d'eau  
solution de ferricyanure de K à 1% (à conserver dans un flacon en verre fumé)

La solution de ferricyanure de K que nous utilisons au cours du dosage sera préparée juste avant usage :

3 ml de la solution de ferricyanure de K 1% amenée  
à 100 ml à l'aide de  $NaOH$  15%.

##### b) Mode opératoire

On mélange dans un décanteur :

1 ml de la solution à doser  
1 ml de la solution de ferricyanure de K fraîchement préparée  
5 ml d'isobutanol saturé d'eau.

Après avoir agité pendant 30 secondes environ, on laisse décanter. La couche aqueuse ayant alors été éliminée, on ajoute à la couche organique, trouble, 1ml d'alcool éthylique pour couper l'émulsion.

Comme l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la concentration en thiamine si celle-ci est comprise approximativement entre 0,01 $\gamma$  et 1 $\gamma$  par ml, on évaluera pour chaque dosage la concentration en thiamine en se référant aux trois solutions étalons et à un essai à blanc où la solution de ferricyanure est remplacée par 1 ml de NaOH 15%.

## 2) Résultats

Grâce à cette méthode de dosage de la thiamine, nous pouvons suivre cette dernière au cours des différentes étapes d'extraction et nous rendre compte si les phases d'adsorption sur les colonnes de résine ainsi que les lavages de ces colonnes n'entraînent pas de perte en vitamine B1. C'est pourquoi, nous évaporons au rotatif séparément l'effluent ainsi que les eaux de lavage d'IRC 50, l'effluent d'IR 120 et enfin HC 1 IN dont nous nous sommes servi pour laver la colonne de résine IR 120. Sur les différents dépôts ainsi obtenus, nous pratiquons un dosage vitaminique en ayant au préalable dissout le dépôt dans un volume d'eau distillée extrêmement faible (1 à 3 ml).

Il est également très important de doser la vitamine B1 dans l'extrait

### a) *Levure de boulangerie*

L'effluent et les eaux de lavage d'IRC 50 ainsi que l'effluent IR 120 ne renferment pas de vitamine B1.

Le résidu provenant de la mise à sec de 50 ml de la solution A (éluat IRC 50) est dissout dans 10 ml d'eau distillée; on dose alors la thiamine dans 1 ml de cette solution : 0,1 $\gamma$  soit en ramenant à 1 gramme de Levure pressée : 4 $\gamma$  de vitamine B1.

Après avoir évaporé à sec à l'évaporateur rotatif les 500 ml d'HC 1 IN qui ont servi à laver la colonne d'IR 120, nous dissolvons le résidu dans 10 ml d'eau; en dosant alors la thiamine nous obtenons une quantité de vitamine B1 inférieure à 0,5 $\gamma$ .

Enfin, si nous réduisons à sec les 100 ml de la solution B et que nous dissolvons le résidu obtenu dans 10 ml d'eau, la quantité de vitamine B1 dans 1 ml de cette solution est comprise entre 0,2 $\gamma$  et 0,25 $\gamma$  soit pour la solution B totale 20 $\gamma$  à 25 $\gamma$ .

**Conclusion :** Il semble donc qu'on perde une fraction de vitamine B1 par passage sur colonne IR 120, car pour une même quantité de solution A, avant et après passage sur IR 120, on obtient les résultats

suivants : avant passage sur IR 120 : 30 $\gamma$

après passage sur IR 120 : 20 - 25 $\gamma$

### b) *Mucor racemosus*

L'extrait n° 0 provenant de 0,389 grammes de mycélium sec renferme 2 $\gamma$  de vitamine B1.

C'est au cours de l'extraction n° I que nous avons dressé le bilan vitaminique : l'effluent et les eaux de lavage d'IRC 50, l'effluent d'IR 120 et les 300 ml d'HCl 1N qui ont servi à laver la colonne d'IR 120 ne renferment pas de vitamine B1.

L'extrait n° I correspondant à 0,224 g de mycélium sec renferme 1γ de vitamine B1.

En conséquence, l'extrait provenant de 1 gramme de mycélium sec de *Mucor racemosus* renferme 5γ de vitamine B1.

#### c) *Neurospora crassa*

Comme dans le cas précédent, l'effluent et les eaux de lavage d'IRC 50, l'effluent d'IR 120 et les 300 ml d'HCl 1N ne renferment pas de vitamine B1.

Dans l'extrait final on note la présence de 1,5γ de vitamine B1.

Par conséquent, l'extrait provenant de 1 gramme de mycélium sec de *Neurospora crassa* renferme 6γ de vitamine B1.

#### d) *Levure Haute*

En dosant la vitamine B1 dans l'extrait n° 0 provenant de 0,8 g de Levure humide, on obtient 1γ de thiamine.

### IV) ETUDE DE L'EXTRAIT

#### 1) Electrophorèse préliminaire à pH 3,9

##### a) *Levure de Boulangerie*

Nous allons d'abord préparer l'extrait que nous comptons étudier.

50 ml de la solution C sont évaporés à sec au rotatif et le résidu obtenu (soit 6,75 mg) est dissout dans 0,5 ml d'eau distillée : ceci constitue donc l'extrait total.

Si nous voulons nous rendre compte de l'existence de polypeptides il est absolument nécessaire de pratiquer une hydrolyse de l'extrait. En conséquence, nous réduisons à sec 50 ml de la solution C et le résidu obtenu (6,75 mg) est repris par 1 ml d'HCl concentré fumant R.P. Ce mélange, en tube scellé, est placé dans un bain d'huile à 110° pendant 6 heures. Après hydrolyse, on amène à sec le mélange en le plaçant au dessiccateur sur potasse pendant une nuit. Le dépôt ainsi obtenu, dissous dans 0,5 ml d'eau constitue l'extrait total hydrolysé.

Nous allons donc étudier la composition en acides aminés de ces deux extraits à l'aide d'une électrophorèse à pH 3,9.

Trois dépôts sur papier Arches n° 304 :

— témoins : acide aspartique, acide glutamique, alanine, histidine, colamine, tyramine.

— extrait non hydrolysé : 40μ l soit 0,54 mg de résidu

— extrait hydrolysé : 40μ l soit 0,54 mg de résidu

Conditions : + à — ; tension 380 volts ; durée 2 heures.

Résultats : (voir fig. 1)

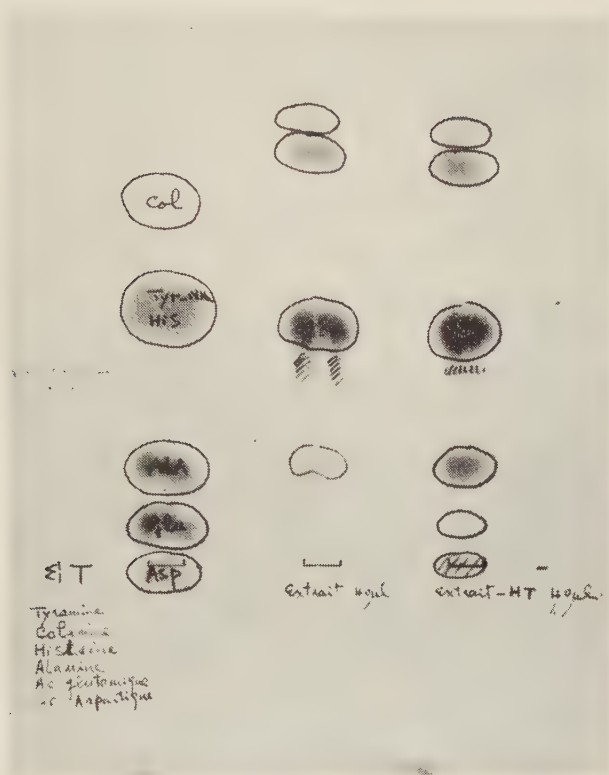


Fig. 1

— extrait avant hydrolyse :

pas de cystéine ni de colamine

acides aspartique et glutamique : néant

neutres : traces

basiques : très importants

amines : 2 taches de moyenne intensité au-delà de colamine

— extrait après hydrolyse :

pas de cystéine ni de colamine

acides aspartique et glutamique : faibles

neutres : nette augmentation

basiques et amines : sans grand changement

**Conclusion :** L'extrait non hydrolysé renferme des polypeptides.

*b) Levure Haute*

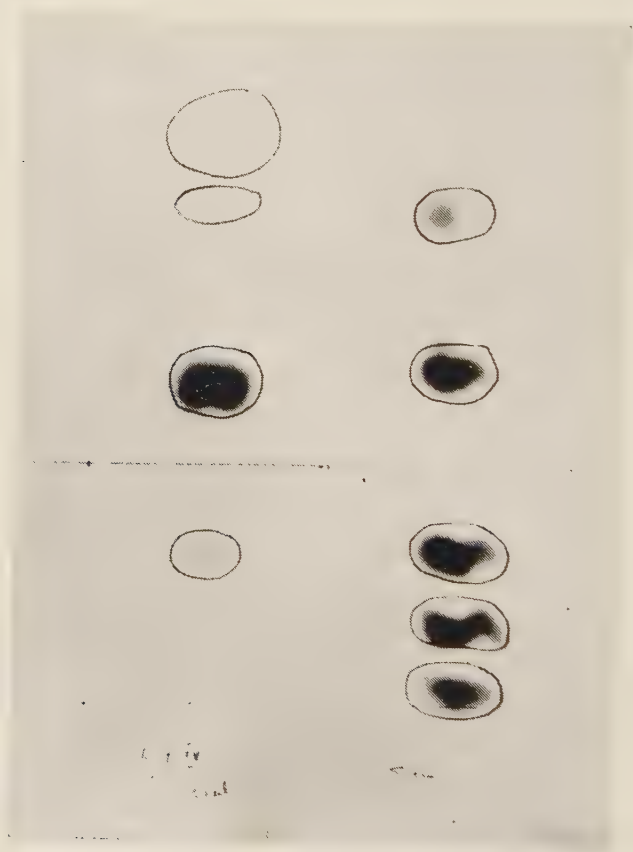
Etudions d'abord l'extrait n° I

Trois dépôts sur papier Arches n° 304 :

- témoins : acides aspartique et glutamique, alanine, histidine, colamine.
- extrait n° I : 40  $\mu$  l
- extrait n° I : 80  $\mu$  l

Conditions : + à — ; tension 380 volts; durée 1 heure 3/4

**Résultats :** (voir fig. 2)



*Fig. 2*

Pas de colamine ni de cystéine  
acides aspartique et glutamique : néant  
neutres : faible concentration  
basiques : importants  
amines : deux taches au-delà de la colamine

En pratiquant deux nouvelles électrophorèses à pH 3,9 dans les mêmes conditions, mais sur les extraits n° II et III, nous obtenons les mêmes résultats.

c) *Mucor racemosus*

Faisons d'abord une électrophorèse pour étudier l'extrait n° II. Deux dépôts sur papier Arches n° 304 :

— témoins : comme précédemment

— extrait n° II : 120  $\mu$  l

Conditions : + à — ; tension 380 volts; durée 1 heure 3/4

Résultats : (voir fig. 3)

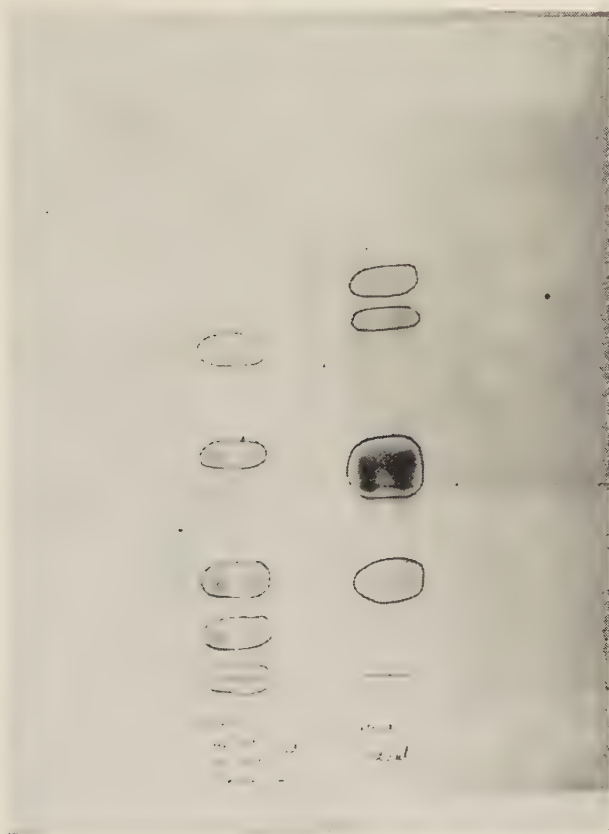


Fig. 3

pas de cystéine ni de colamine  
acides aspartique et glutamique : néant  
neutres : concentration faible  
basiques : importants  
amines : deux taches au-delà de la colamine

En refaisant une électrophorèse à l'aide de l'extrait n° I, on obtient exactement les mêmes résultats.

d) *Neurospora crassa*

Deux dépôts sur papier Arches n° 304 :

— témoins : acides aspartique et glutamique, alanine, arginine, colamine

— extrait : 80  $\mu$  l

Conditions : + à — ; tension 380 volts; durée 1 heure 3/4

Résultats : (voir fig. 4)

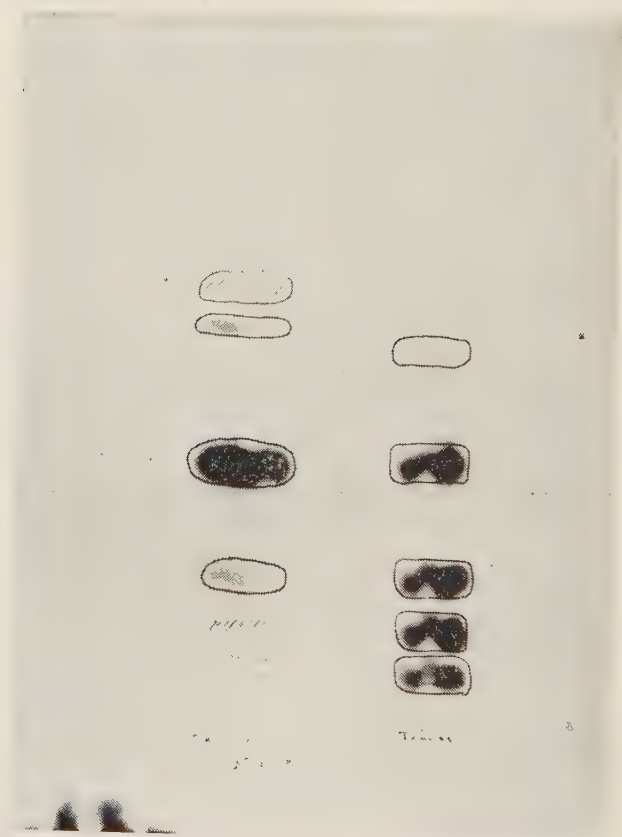


Fig. 4

pas de colamine ni de cystéine  
acides aspartique et glutamique : traces  
neutres : faible concentration  
basiques : importants  
amines : deux taches au-delà de la colamine

## 2) Etude des acides aminés neutres (Levure de boulangerie)

Comme la concentration des acides aminés neutres dans l'extrait avant hydrolyse est trop faible pour permettre une étude qualitative, nous nous attacherons uniquement à étudier les acides aminés neutres dans l'extrait hydrolysé.

A cet effet, nous pratiquons d'abord une électrophorèse à pH 3,9 qui nous servira également pour l'étude des acides aminés basiques qui suivra.

Trois dépôts sur papier Arches n° 304 :

— témoins : acides aspartique et glutamique, alanine, histidine, arginine, colamine

— extrait non hydrolysé : 80  $\mu$  l soit 1,1 mg de résidu

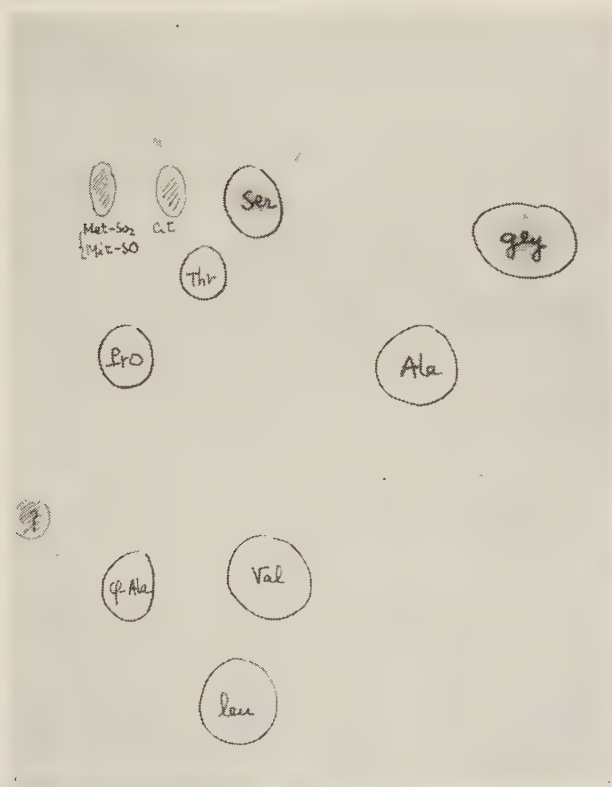
— extrait hydrolysé : 120  $\mu$  l soit 1,6 mg de résidu

Conditions : + à — ; tension 380 volts; durée 4 heures

On élue alors la tache des acides aminés neutres sur une feuille Whatmann n° 3; la séparation des acides aminés s'effectue alors par couplage d'une électrophorèse à pH 2,4 et d'une chromatographie unidimensionnelle dans le solvant butanol, acide acétique, eau.

Résultats : (voir fig. 5 ci-dessous)

*N-Extrait-HT 120  $\mu$ l*



Liste des acides aminés par ordre d'importance décroissante : glyco-colle et leucine; alanine et valine; sérine; proline; thréonine; phénylalanine.

et à l'état de traces : citrulline, méthionine SO et méthionine SO<sub>2</sub>.

### 3) Etude des acides aminés basiques

#### a) Levure de boulangerie

Après élution des deux taches d'acides aminés basiques provenant de l'électrophorèse ph 3,9 dont nous avons parlé au chapitre consacré à l'étude des acides aminés neutres, sur papier Whatmann n° 1, on pratique une électrophorèse à ph 11,7.

Après avoir révélé l'électrophorégramme à la ninhydrine, on pratique un dosage des différents acides aminés basiques.

#### Résultats :

|           | Quantités d'acides aminés en $\gamma$ par gramme de Levure |                 |
|-----------|------------------------------------------------------------|-----------------|
|           | avant hydrolyse                                            | après hydrolyse |
| arginine  | 247                                                        | 217             |
| lysine    | 23                                                         | 37              |
| ornithine | traces                                                     | 8               |
| histidine | 26                                                         | 37              |

#### b) Levure Haute, *Mucor racemosus*, *Neurospora crassa*

Pour chaque microorganisme, il faut d'abord réaliser une électrophorèse préliminaire à ph 3,9 dont on révélera uniquement les témoins à la ninhydrine.

Dans les trois cas, les témoins sont les mêmes : acides aspartique et glutamique, alanine, arginine et colamine.

Quant à l'extrait, nous faisons un dépôt de 80 $\mu$  l pour Levure Haute, de 140 $\mu$  l pour *Mucor racemosus*, de 80 $\mu$  l pour *Neurospora crassa*.

Les conditions électrophorétiques sont identiques dans les 3 cas : + à — ; tension 380 volts; durée 3 heures.

Après avoir élué chaque tache d'acides aminés basiques sur une feuille Whatmann n° 1, on pratique l'électrophorèse à ph 11,7.

Les électrophorégrammes une fois séchés, puis révélés à la ninhydrine, on dose les acides aminés basiques.

## Résultats :

Quantités d'acides aminés en  $\gamma$  dans chacun des dépôts :

|           | Levure Haute | Mucor racemosus | Neurospora crassa |
|-----------|--------------|-----------------|-------------------|
|           | 80 $\mu$ l   | 140 $\mu$ l     | 80 $\mu$ l        |
| arginine  | 17,2         | 11,8            | 21,3              |
| lysine    | 2            | 1               | 2,3               |
| ornithine | traces       | traces          | traces            |
| histidine | traces       | traces          | traces            |

Quantités d'acides aminés par gramme de matière première (en  $\gamma$ ):

|          | Pour 1 g de<br>Levure Haute<br>humide | Pour 1 g de<br>mycélium sec de<br>Mucor racemosus | Pour 1 g de<br>mycélium sec<br>Neurosp. crassa |
|----------|---------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| arginine | 49                                    | 315                                               | 790                                            |
| lysine   | 5,5                                   | 27                                                | 87                                             |

**N.B.** Du fait d'une diminution de la concentration en arginine après hydrolyse, de l'extrait de Levure de boulangerie, on peut se poser la question : l'arginine est-elle seule ou accompagnée d'autres amines telles que tyramine ou glucosamine ? Ces deux amines sont en effet situées au même endroit que l'arginine après électrophorèse à pH 3,9 et après électrophorèse à pH 11,7. La glucosamine est dégradée au cours de l'hydrolyse.

Pour résoudre cette question, nous allons pratiquer une électrophorèse à pH 3,9 sur l'extrait total (80 $\mu$  l). La bande des acides aminés basiques est alors éluee sur une feuille Whatmann n° 1 en vue d'une chromatographie bidimensionnelle classique dans les solvants butanol-eau-acide acétique et phenol- ammoniacque.

En effet dans un tel chromatogramme, les amines en question ne sont pas situées au même endroit que l'arginine.

**Conclusion :** On retrouve les taches d'ornithine, lysine, histidine et arginine. Aucune autre tache n'étant visible sur le chromatogramme, on peut conclure que l'arginine n'est associée à aucune autre substance décelable à la ninhydrine, ceci après électrophorèse à pH 11,7.

## V) ETUDE DE LA BANDE VITAMINIQUE

### 1) Levure de boulangerie

On prélève 50 ml de la solution C qu'on évapore à sec; le résidu est redissout dans 0,5 ml d'eau (voici donc l'extrait).

D'autre part, on prépare une solution de vitamine B1 à 500 $\gamma$  par ml soit 10 $\gamma$  par 20 $\mu$  l.

On pratique alors sur une feuille Whatmann n° 3 à 10 cm du bord 6 dépôts de 2 cm de large, constitués chacun par :

20 $\mu$  l de solution vitaminique soit 10 $\gamma$  de vitamine B1  
+ 40 $\mu$  l d'extrait soit 0,54 mg de résidu

La durée de la chromatographie est de 24 heures; après quoi on sèche la feuille à la température ambiante pendant 3 jours.

On prélève ensuite 4 bandes vitaminiques qu'on élue à l'aide de l'appareil de BISERTE (1) en un même point sur une feuille Arches n° 304, en vue d'une électrophorèse à pH 3,9.

Dépôt des témoins : acides aspartique et glutamique, alanine, histidine, colamine.

Conditions : + à — ; tension 380 volts ; durée 2 heures

**Résultats :**

acide aspartique : néant  
acide glutamique : très faibles traces  
neutres : faible concentration  
basiques et amines : néant  
présence d'une deuxième tache.

La deuxième tache est-elle constituée de  $\beta$  alanine ou d'acide  $\gamma$  aminobutyrique ? En refaisant une nouvelle électrophorèse après avoir élué 2 bandes vitaminiques et en prenant 2 témoins renfermant l'un la  $\beta$  alanine, l'autre l'acide  $\gamma$  aminobutyrique, il nous est impossible de conclure sur la nature exacte de cette deuxième tache, car elle est située entre l'acide  $\gamma$  aminobutyrique et la  $\beta$  alanine (voir fig. 6).



Fig. 6

Si nous connaissons maintenant les substances, décelables à la ninhydrine, accompagnant la thiamine au niveau de la bande vitaminique, il serait intéressant de pouvoir localiser la vitamine B1 sur l'électrophorogramme.

A cet effet nous faisons la manipulation suivante :

Une bande vitaminique provenant d'une chromatographie sur papier est éluee sur une feuille de papier Arches n° 304 en vue d'une électrophorèse à pH 3,9; cette bande renfermait 10  $\gamma$  de thiamine.

Dépôts de 2 témoins de même composition :

acides aspartique et glutamique, alanine, histidine, colamine et 10 $\gamma$  de vitamine B1.

Conditions : + à — ; tension 380 volts; durée 2 heures

Après séchage, l'un des témoins est révélé à la ninhydrine, alors que le deuxième témoin ainsi que l'extrait sont révélés à l'aide du réactif de SILIPRANDI.

### Résultats :

Les deux taches de thiochrome, observées à la lampe U.V. sont situées à la même distance par rapport à la ligne de dépôt, entre la zone des acides aminés basiques et la zone à colamine

#### 2) *Mucor racemosus*

On pratique comme précédemment 6 dépôts sur une feuille Whatmann n° 3, chaque dépôt étant constitué par 10 $\gamma$  de vitamine B1 et 40 $\mu$  l d'extrait n° I. La chromatographie dure 24 heures.

Le chromatogramme une fois séché, on prélève 5 bandes vitaminiques qu'on élue en un même point sur une feuille Arches n° 304. Dépôts de 2 témoins :

— témoin I : acides aspartique et glutamique, alanine, histidine, colamine,  $\beta$  alanine.

— témoin II : acides aspartique et glutamique, alanine, histidine, colamine, acide  $\gamma$  aminobutyrique.

Conditions : + à — ; tension 380 volts; durée 1 heure 3/4.

**Résultats :** acides aspartique et glutamique : néant

(fig. 7) neutres : faible quantité

voir page basiques et amines : néant

suivante. traces d'acide  $\gamma$  aminobutyrique. ? ?

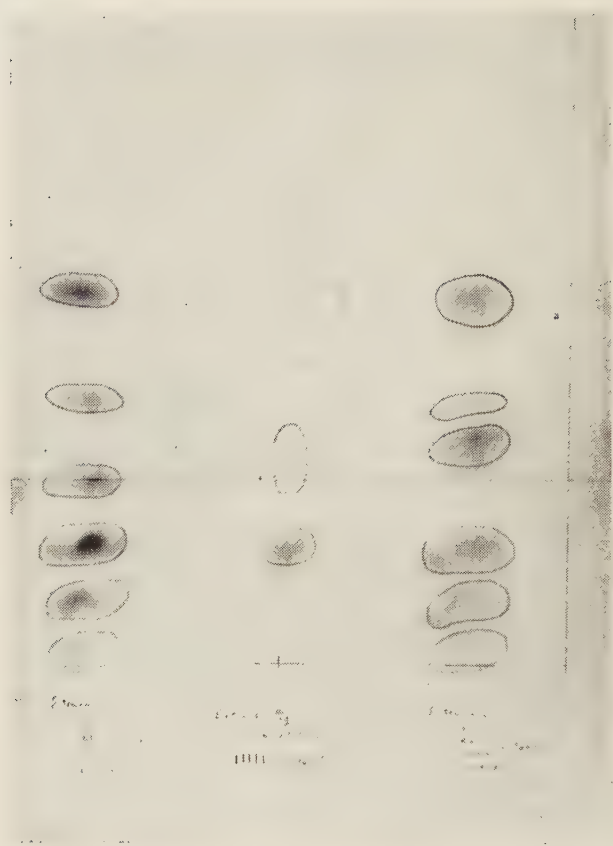


Fig. 7

### 3) *Neurospora crassa*

On pratique comme précédemment 6 dépôts de 2 cm de large sur une feuille Whatmann n° 3; chaque dépôt est constitué par 10 $\gamma$  de thiamine et 40 $\mu$  l d'extrait.

La chromatographie terminée, on sèche la feuille à la température ambiante pendant 3 jours.

On élue 5 bandes vitaminiques en un même point sur une feuille Arches n° 304.

— témoin : acides aspartique et glutamique, alanine, arginine, colamine, acide  $\gamma$  aminobutyrique.

Conditions : + à — ; tension 380 volts; durée 1 heure 3/4

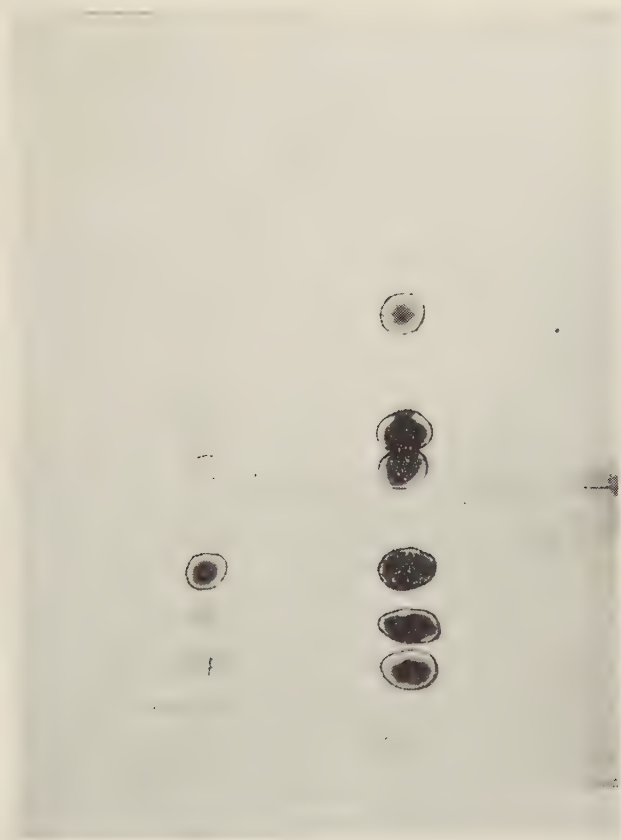
**Résultats :** (voir fig. 8)

acides aspartique et glutamique : traces

neutres : faible concentration

basiques et amines : néant

traces d'acides  $\gamma$  aminobutyrique. ? ?



*Fig. 8*

**4) Levure Haute**

Six dépôts sur une feuille Whatmann n° 3; chaque dépôt est composé de 10 $\gamma$  de vitamine B1 et de 40 $\mu$  l d'extrait n° III.

Durée de la chromatographie : 22 heures.

Le chromatogramme une fois sec, on prélève 5 bandes vitaminiques qu'on élue sur une feuille Arches n° 304.

— Témoin: acides aspartique et glutamique, alanine, arginine, colamine, acide  $\gamma$  aminobutyrique.

Conditions : + à — ; tension 380 volts; durée 1 heure 3/4

**Résultats :** (voir fig. 9)

acides aspartique et glutamique : néant

neutres : faible concentration

basiques et amines : néant

traces d'acide  $\gamma$  aminobutyrique. ? ?



*Fig. 9*

Si nous voulons connaître les acides aminés neutres qui accompagnent la thiamine au niveau de la bande vitaminique, il est nécessaire de chromatographier une plus grande quantité d'extrait.

A cet effet, nous pratiquons une nouvelle extraction de vitamine B1 à partir de 2,160 grammes de Levure Haute, en adoptant rigoureusement le même mode opératoire que pour l'extraction de la thiamine à partir de la fraction n° III de Levure Haute.

Nous obtenons ainsi 10 mg de résidu que nous dissolvons dans 0,8 ml d'eau distillée (extrait n° IV).

C'est en partant de cet extrait que nous allons pratiquer deux chromatographies sur papier Whatmann n° 3, comprenant chacune 6 dépôts de 2 cm de large; chaque dépôt est composé de 10  $\gamma$  de vitamine B1 et de 40  $\mu$  l d'extrait n° IV.

Cinq bandes vitaminiques sont alors éluées en un point sur une feuille Arches n° 304, les 5 autres bandes étant éluées en un autre point sur cette même feuille.

Témoin : acides aspartique et glutamique, alanine, arginine, colamine.

Conditions : + à — ; tension 380 volts; durée 1 heure 3/4

Les deux bandes correspondant aux acides aminés neutres sont alors éluées en un seul point sur une feuille Whatmann n° 3 en vue d'une électrophorèse à ph 2,4 couplée à une chromatographie unidimensionnelle (solvant : butanol, eau, acide acétique).

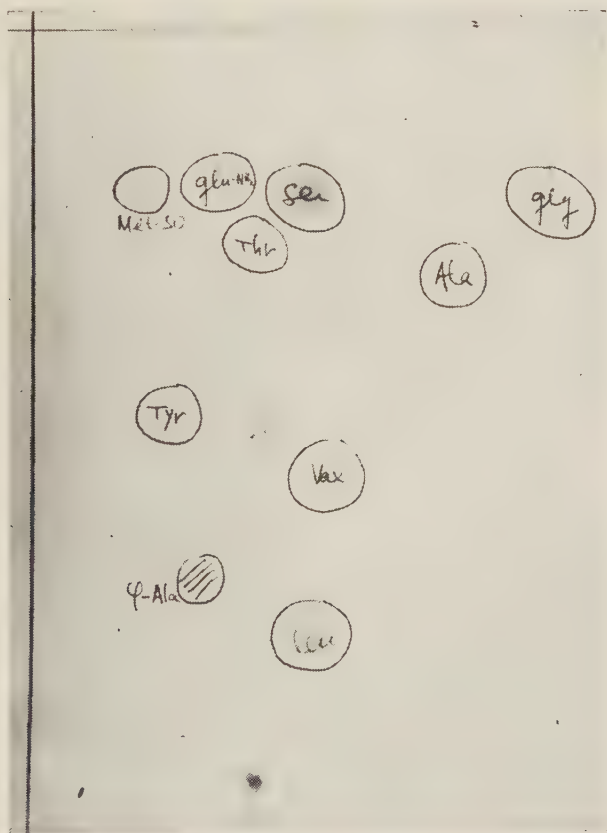


Fig. 10

### Résultats :

Liste des acides aminés par ordre d'importance décroissante :  
(voir fig. 10)

serine; glycocolle et alanine;  
valine; leucine; glutamine; threonine, tyrosine;  
et à l'état de traces : phenylalanine et méthionine.

## CONCLUSION

De cette étude, nous pouvons tirer deux conclusions importantes :

1) La chromatographie sur papier est très efficace pour purifier la vitamine B1; en effet la bande vitaminique ne renferme plus d'acides aminés basiques, ni d'amines.

2) L'électrophorèse de la bande vitaminique est en elle même un moyen efficace de purification de la thiamine; la vitamine B1 est nettement séparée des acides aminés neutres sur l'électrophorégramme ainsi que des acides dicarboxyliques s'ils existent.



## BIBLIOGRAPHIE

- 1 - G. BISERTE - Bull. Soc. Chim. biol. - **39**, 661 (1957).
- 2 - G. BISERTE, P. BOULANGER et P. PAYSANT - Bull. Soc. Chim. biol. - **40**, 2067 (1958).
- 3 - D. SILIPRANDI et N. SILIPRANDI - Biochem. Biophys. Acta - **14**, 52 (1954).
- 4 - J. E. VINCENT - Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas - **76**, 779 (1957)
- 5 - The Analyst - **76**, 127 (1951).
- 6 - R.S.W. THORNE - J. inst of Brewing - **55**, 18-26 (1949).
- 7 - G. BISERTE, T. PLAQUET-SCHOONAERT, P. BOULANGER, P. PAYSANT, J. Chromatog. - **3**, 25-47 (1960).
- 8 - MICHL - Monatshefte Chem. - **82**, 489 (1951).
- 9 - BELL, HOWARD... - J. Am. Chem. Soc. - **78**, 5059 (1956).
- 10 - HOROWITZ - J. Biol. Chem. - **171**, 255 (1947).
- 11 - S. MOORE et W. H. STEIN - J. Biol. Chem. - **176**, 367 (1948).





Vu et approuvé

Nancy, le 16 septembre 1960

Le Doyen de la Faculté des Sciences

E. URION

Vu et permis d'imprimer

Nancy, le        septembre 1960

Le Recteur:

P. IMBS





IMPRIMERIE LÉON LOUIS & C<sup>ie</sup>  
BOULAY-MOSELLE

X-2009

---

Dépôt légal n° 12  
4<sup>e</sup> trimestre 1960



